

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-503015

(43) 公表日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F 1
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
5/10		C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 5/00 B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願平8-529738
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 3月27日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 9月29日
 (86) 国際出願番号 PCT/US 96/04445
 (87) 国際公開番号 WO 96/30498
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 10月3日
 (31) 優先権主張番号 08/412, 826
 (32) 優先日 1995年3月29日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 アブジェニックス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレ
 モント ダンバートン サークル 7601
 (71) 出願人 日本たばこ産業株式会社
 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号
 (72) 発明者 ジャコボピッツ アヤ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 メン
 ロパーク モンテリー アベニュー 2021
 (72) 発明者 ズセボ クリスティナ エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウッ
 ドサイド アレン ロード 200
 (74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Cre 媒介部位特異的組換えを用いる抗体の作製

(57) 【要約】

改変された免疫グロブリン遺伝子座を有する細胞のゲノムの配列から抗体を発現する細胞を作出する方法を開示する。本方法は、Creが媒介する部位特異的組換えおよび相同的組換えを利用している。本方法は、lox部位を免疫グロブリン遺伝子座に初めて導入することを含み、Creが媒介するインビガでの組換えによって、遺伝子改変を導入するための標的としてこのlox部位を用いることを含む。

【特許請求の範囲】

1. 改変された免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を作出する方法において、該遺伝子座を改変するためにCre媒介部位特異的組換えを用いる、以下を含む方法：

(a) (i) 第一のlox部位と、(ii) インビボでのゲノムDNAの部位特異的相同的組換えにより、該ゲノム配列中に該第一lox部位が挿入されるように、改変された領域に置き換えられるべき該ゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接した第一のDNA配列に相同的な標的配列とを含む、第一の相同性標的ベクターによって抗体産生細胞をトランスフェクションすること、

(b) (i) 該第一lox部位とのCre媒介による組換えに適した第二のlox部位と、(ii) 免疫グロブリン遺伝子座の該領域を、改変されるべき領域に置き換えるための改変配列とを含む、lox標的ベクターによって該細胞をトランスフェクションすること、

(c) Cre媒介による該lox部位の部位特異的組換えによって、改変配列が該ゲノム配列の中に挿入され、それによって、免疫グロブリン遺伝子座の該領域が、改変された該領域に置き換わるように、lox部位をCreと相互作用させること、および、

(d) 免疫グロブリン遺伝子座の該領域が、改変された該領域に変換されたトランスフェクション細胞であり、かつ該抗体分子を産生するトランスフェクション細胞を選抜すること。

2. 段階(c)において、lox部位をCreと相互作用させることにより、マーカー遺伝子が、該lox部位のCre媒介部位特異的組換えによって、改変配列とともにゲノム配列中に挿入され、

段階(d)において、トランスフェクション細胞の選抜が、該マーカー遺伝子を発現するトランスフェクション細胞の選抜を含むように、

lox標的ベクターが、細胞中で発現されるように調節領域に機能的に結合した選抜マーカー遺伝子をさらに含む、請求項1記載の方法。

3. 段階(b)の前に付加的な段階をさらに含む請求項1記載の方法において、この付加的な段階が、

(i) 第一lox部位と第二lox部位とのCre媒介組換えに適した第三のlox部位と、
(ii) 該細胞中で発現されるように調節領域に機能的に結合された第一選抜マーカー遺伝子と、

(iii) 該第三lox部位と該第一マーカー遺伝子とが、インビボでのゲノムDNAによる部位特異的相同的組換えによってゲノム配列中に挿入されるように、第一DNA配列と第二DNA配列とに接している該ゲノム配列の置き換えられるべき免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接する第二DNA配列に相同な標的配列、
とを含む第二の相同標的ベクターによって、該細胞をトランスフェクションすることを含み、かつ、

段階(c)において、lox部位をCreと相互作用させることにより、第二マーカー遺伝子が、該lox部位のCre媒介部位特異的組換えによって改変配列とともに該ゲノム配列中に挿入されるように、

段階(b)において、lox標的ベクターが、該細胞中で発現されるよう調節領域に機能的に結合した第二の選抜マーカー遺伝子をさらに含み、

段階(d)において、トランスフェクション細胞の選抜が、該第二マーカー遺伝子を発現するトランスフェクション細胞の選抜を含む、方法。

4. 段階(c)において、lox部位をCreと相互作用させることにより、改変配列と第二マーカー遺伝子とがゲノム配列に挿入された後、Cre媒介部位特異的組換えによって、第一マーカー遺伝子と置き換えられるべき該領域とが削除され、
かつ、

段階(d)において、トランスフェクション細胞の選抜が、該第一マーカー遺伝子を発現させないトランスフェクション細胞の選抜をさらに含む、請求項3記載の方法。

5. 改変された領域に置き換えられるべき免疫グロブリン遺伝子座の領域が、定常領域遺伝子と、以下の一つを含む改変配列とを含む、請求項1記載の方法：

a) 免疫グロブリン遺伝子座の改変された発現を提供するための、ゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子座の調節領域の全部または一部に置き換わる調節ヌクレオチド配列、

b) 改変された抗体分子を作成するために、抗体分子の定常領域または可変領

域のいずれかの全部または一部に置き換わるための翻訳産物をコードするヌクレオチド配列、および、

c) 酵素、毒素、ホルモン、成長因子、またはリンカーをコードする配列。

6. ゲノム配列の定常領域遺伝子が、以下の一つを含む、請求項5記載の方法

a) マウス定常領域遺伝子と、ヒト定常領域遺伝子またはその一部を含む該改変配列、

b) ヒト定常領域遺伝子と、異なるヒト定常領域遺伝子またはその一部を含む改変配列、および、

c) ヒトC_μ遺伝子と、ヒトC_μ定常領域遺伝子を含む改変配列。

7. 抗体分子を発現する細胞が、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の発現によってヒト抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞系である、請求項1記載の方法。

8. 改変された免疫グロブリン遺伝子座を含むゲノム配列から抗体を発現させる細胞から抗体を産生させる方法において、該細胞が請求項1記載の方法によって得られる、以下を含む方法：

(a) 該細胞が該抗体を発現させるような条件の下で該細胞をインキュベートすること、および、

(b) 該細胞によって発現された該抗体を回収すること。

9. lox部位が、ヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接しているか、その中に含まれている、

少なくともヒトの重鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位か、または少なくともヒトの軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位を含むゲノムを有する、非霊長類の哺乳動物の胚幹細胞。

10. lox部位が、ヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接しているか、その中に含まれている、

少なくともヒトの重鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位か、または少なくともヒトの軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位を含むゲノムを有する、非霊長類の遺伝子導入哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

Cre媒介部位特異的組換えを用いる抗体の作製技術分野

本発明は、形質転換された細胞によって、改変された抗体分子が産生されるように、組換えDNAベクターと部位特異的組換えを用いて改変された遺伝子座から抗体を産生させるための処理法に関する。より特定すると、本発明は、例えば、改変された抗体分子を作成するために抗体分子の定常領域もしくは可変領域の全部または一部を置き換えるなどして、免疫グロブリン遺伝子座を改変するために、Cre媒介部位特異的組換えを利用することに関する。一つの特定の局面は、免疫グロブリンの定常領域を、別のクラスの定常領域で置換し、それによって、アイソタイプが変化した改変抗体が産生されるような、インサイチューの抗体産生リンパ球における抗体遺伝子のクラス転換に関する。別の局面は、異なる抗原特異性または変化した抗原特異性を有する可変領域で置換または交換された可変領域またはその一部の改変に関する。

先行技術

脊椎動物系における基本的な免疫グロブリンの構造単位は、約23,000ダルトンの分子量を有する、2つの同一の「軽い」ポリペプチドと、約53,000～70,000ダルトンの分子量を有する、2つの同一の「重い」鎖とから構成されている。この4つの鎖は、ジスルフィド結合によって「Y」形になるよう結合され、ここで、軽鎖は、Yの口が始まる場所で重鎖と一つになり、Fab領域と名づけられた可変領域、すなわち、「枝分かれした」部位まで続いている。重鎖は、ガンマ (γ)、ミュー (μ)、アルファ (α)、デルタ (δ) またはイプシロン (ϵ) に分類されるが、これらは種によって多様な、いくつかのサブクラスを有する。すなわち、長い定常領域を有するこの鎖の性質により、それぞれIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgEという、抗体の「クラス」に決定されるのである。軽鎖は、カッパ (κ) またはラムダ (λ) のいずれかに分類される。重鎖のクラスはいずれも、軽鎖のいずれにも結合することができる。軽鎖と重鎖は、互いに共有結合しており、免疫グロブリンがハイブリドーマまたはB細胞によって産生されると、2本の重鎖の「尾」の部分は、共有的なジスルフィド結合によって互いに結合する。

それぞれの免疫グロブリンの鎖のアミノ酸配列は、Yの先にあるN末端から始まり、一番下のC末端まで続いている。N末端には、それが結合する抗原に特異的な可変領域(V)があり、長さは約100アミノ酸であるが、この部位は、軽鎖と重鎖の間で変異があり、抗体によって差異がある。いずれの鎖でも、可変領域は、鎖の残りの部分に広がる定常領域(C)に結合している。結合は、軽鎖遺伝子では、ジョイニング(J)領域として知られる結合配列で、約12アミノ酸をコードする配列を通じて結合しており、また、重鎖遺伝子では、合わせて約25アミノ酸をコードしている、多様性(D)領域とジョイニング(J)領域の組み合わせになっているのが、ゲノムレベルで見られる。鎖の残りの部分は定常領域であるが、抗体特異性(すなわち、抗体が結合する抗原)を有する特定のクラスの中では変異がない。定常領域またはクラスにより、補体の活性化およびその他の細胞性応答を含む、抗体のその後のエフェクター機能が決定され、可変領域により、それが反応する抗原が決定される。

コーラー(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)によって、モノクローナル抗体産生のための細胞融合技術が開発されて以来、多数の特異的な免疫グロブリン種が、大量に産生されてきた。これらのモノクローナル抗体のほとんどは、マウス系で産生されているので、何らかの方法で、マウスのモノクローナル抗体が、ヒトの免疫システムによって、外来エピトープとして「認識」されて「中和」されないように改変されない限り、ヒトの治療薬として利用することには限界があった。

この問題に対する解決法の一つとして、外来エピトープとして「認識され」にくく、ヒトにおいてモノクローナル抗体を用いることに伴う問題を克服できる、ヒトまたは「ヒト化された」モノクローナル抗体の開発が試みられた。ヒトB細胞ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体の実用化は、癌、ウイルスまたは微生物による感染、抗体産生欠乏によるB細胞免疫不全、その他の免疫システムの疾患および異常を治療するために非常に有望であると考えられていた。

しかし、ヒトモノクローナル抗体の開発に関しては、いくつかの障害が存在している。例えば、癌の診断および治療に用いるヒトの腫瘍抗原を認識するモノク

ローナル抗体に関して云えば、これらの腫瘍抗原の多くは、ヒトの免疫システムによって外来抗原としては認識されない。したがって、これらの抗原は、人間では免疫原性がないかもしれない。

ヒトのモノクローナル抗体に伴う別の問題は、細胞培養で得られるこのような抗体のほとんどが、IgM型という一つのクラスまたはアイソタイプであるということである。診断的または治療的効力の観点からすると、一定の環境の下では、一つのアイソタイプのモノクローナル抗体の方が、他のアイソタイプのものより望ましい。なぜなら、上述したように、アイソタイプによって、補体の活性化およびその他の細胞性応答を含む、抗体のその後のエフェクター機能が決定されるためである。例えば、抗体媒介による細胞傷害に関する研究から、一般的に、サブタイプ $\gamma 2a$ および $\gamma 3$ の、未修飾のマウスモノクローナル抗体は、サブタイプ $\gamma 1$ の抗体よりも、標的細胞を傷害するのに効果的であることが知られている。この特異的な効力は、サブタイプ $\gamma 2a$ および $\gamma 3$ が、標的細胞の細胞傷害的な破壊に、より積極的に関与することができるためだと考えられている。最初の融合から選択することによって直接的に、またはクラス転換変異株を単離する「同胞(sib)選抜」技術を用いて、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親株ハイブリドーマから二次的に、マウス・モノクローナル抗体の特定のアイソタイプを調製することができる(ステプリュースキ(Steplewski)ら、1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8653; スピラ(Spira)ら、1984, *J. Immunological Methods* 74: 307)。

IgG型のヒト・モノクローナル抗体が望ましい場合には、IgM型抗体を産生する大多数の細胞から、IgGまたは他の型の抗体を産生する僅かな細胞を同定、単離するために、細胞選別などの単純な技術を用いる必要があった。このため、予定されたまたは望ましい抗体特異性を有する一定の抗体を得るために、単離された抗体産生細胞において、抗体のクラスを転換する方法が必要とされている。

モノクローナル抗体をヒトに用いることに伴う、これらの課題に対するさまざまな解決法が、免疫グロブリン遺伝子の発現を得るために哺乳動物の細胞の中にDNAを導入するための最近の方法、特に、ヒトの部分とヒト以外の部分を有するキメラ免疫グロブリン分子を作出するための方法に基づいて開発されてきた。よ

り

特異的には、キメラ抗体の抗原結合領域（可変部）は、ヒト以外の生物源（例えば、マウス）に由来し、キメラ抗体の定常領域（免疫グロブリンに生物学的なエフェクター機能付与する領域）は、ヒトに由来している。このような「ヒト化された」キメラ抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性と、ヒトの抗体分子によって付与されるエフェクター機能を有する。

一般的に、キメラ抗体は、従来、以下の段階（しかし、必ずしも、以下の順序には従わない）を含む手順によって作製されてきた。すなわち、（１）抗体分子の抗原結合部位をコードする遺伝子部分を同定し、クローニングすること、ただし、この遺伝子部分は（重鎖については、VDJ領域、軽鎖については、VJ領域、より簡潔に言えば、可変領域）、cDNAまたはゲノムから得られる、（２）定常領域またはその望ましい部分をコードする遺伝子部分をクローニングすること、（３）転写および翻訳可能な形で、完全なキメラ抗体がコードされるように、可変領域と定常領域とを連結すること、（４）この構築物を、選抜用マーカーと適当な遺伝子調節領域とを有するベクターの中にライゲーションすること、（５）この構築物をバクテリア中で増幅すること、（６）このDNAを、リンパ球のような、最も頻繁に培養される真核細胞の中に（形質転換によって）導入すること、（７）選抜用マーカーを発現している細胞を選抜すること、（８）必要とするキメラ抗体を発現する細胞を得るためにスクリーニングすること、および、（９）適切な結合特異性とエフェクター機能とを有するか否かについて、抗体を試験すること。

キメラ蛋白質を作出するための、これらの処理手順によって、いくつかの異なる抗原結合特異性を有する抗体が作出された。さらに、抗原結合領域をコードする配列に、新しい配列を結合させることによって、いくつかの異なるエフェクター機能が作出された。これらの中には、酵素（ニューベルガー (Neuberger) ら、1984, Nature 312: 604）、別の生物種に由来する免疫グロブリンの定常領域、および別の免疫グロブリン鎖の定常領域（シャロン (Sharon) ら、1984, Nature 309: 364; タン (Tan) ら、1985, J. Immunol. 135: 3565~3567）が含まれる。ノイバ

ーガーらも、PCT国際公開公報第86/01533号(1986)において、キメラ抗体の作出について開示し、その技術の多数の利用法の中で、「クラス転換」の概念に言及し

ている。

キャビリー (Cabilly) らは、1993年4月13日公開の米国特許第4,816,567号で、組換え細胞培養において調製される、定常部-可変部キメラを含む、変化した免疫グロブリンと本来の免疫グロブリンについて説明している。これらの免疫グロブリンは、予定された抗原に免疫学的に結合することができる可変領域を含んでいる。開示されたベクターおよび方法は、広範な原核生物または真核生物を含む多様な宿主において用いるのに適している。

フェル (Fell) らは、1993年4月13日公開の米国特許第5,202,238号で、組換えDNAベクターと、インビボにおける相同的組換えとを用いてキメラ抗体を作出するための処理方法について説明している。この処理方法は、(a) 抗体分子の抗原結合部位は変わらないままで、抗体分子の定常領域もしくはその一部が置換もしくは改変されているような、望ましい抗原特異性を有する抗体を産生する細胞株、または、(b) 抗体分子の抗原結合部位は変わらないままで、抗体分子の可変領域もしくはその一部が置換もしくは改変されているような、望ましいエフェクター機能を示す望ましいクラスの抗体を産生する細胞株のいずれかにおいて、相同的組換えによって、標的とされた遺伝子の改変を行うための、新しい組換えDNAベクターを用いる。しかしながら、報告されている組換え効率は、比較的低く、組換えられたゲノムを回収するために、選抜用マーカーを用いたときでも、マウスの重鎖定常領域をヒトの対応部位で置換しようとする何回かの試行においては、0.39%から0.75%の間であった。

クーカーラパティ (Kucherlapati) らは、PCT国際公開公報第91/10741号(1991年7月25日公開)と、PCT国際公開公報第94/02602号(1994年2月3日公開)において、適当な免疫原で哺乳動物を免疫することによって非霊長類で生存能力のある哺乳動物宿主の中で産生される異種特異的な蛋白質または抗体を開示している。特に、これらの公開公報は、酵母の人工染色体(YAC)を用いて、ヒトの免

疫グロブリンの重鎖と軽鎖にあたる遺伝子座を作製して組み込んだマウスから、抗原特異的なヒトのモノクローナル抗体が産生されることを開示している。このようなマウスにおいて、マウスの免疫系に正常に認識される、ヒト抗原を含む抗原による免疫化に応答して完全なヒト抗体を産生させるため、これらのマウスのB

細胞を用いて、従来のハイブリドーマ作製法によってヒト・モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが作出される。遺伝子組換えマウスハイブリドーマから、完全なヒト抗体を産生することによって、ヒト・モノクローナル抗体を産生するという以前の問題の多くは解決される一方で、例えば、発現を促進したり、エフェクター機能を変化させるために、細胞の中で抗体を産生する遺伝子座を改変することが望ましいかもしれない。

サウアー (Sauer) らは、1990年9月25日公開の米国特許第4,959,317号において、真核細胞のlox部位と名づけられた配列で、部位特異的なDNAの組換えを起こすための方法について説明している。第一のlox部位と第二のlox部位とを含むDNA配列を真核細胞に導入して、Creと名づけられたリコンビナーゼと相互作用させ (典型的には、プラスミドからリコンビナーゼを一時的に発現させて)、それによって、lox部位で組換えを起こさせる。真核細胞の例としては、酵母細胞、およびマウス細胞系の単層培養が含まれる。Cre媒介による組換えの頻度は、例証的なウイルスとプラスミドの間で組換え実験を繰り返したところ、2~3%から22%の範囲内であり、lox部位に隣接するleu2遺伝子の欠失例については、98%であった。しかし、サウアー (Sauer) らは、リンパ様細胞における組換えについても、免疫グロブリンの操作についても開示していない。

グー (Gu) らは、[1993年のCell 73:1155~1164]で、Cre媒介部位特異的組換えを用いて、重鎖遺伝子座のJ領域およびイントロン・エンハンサーが胚幹細胞から欠失したマウス系統を作製する方法を説明している。そして、彼らは、ヘテロ接合の変異B細胞の中で、組換えによって作られた免疫グロブリンのアイソタイプを、LPSとIL4で活性化して解析した。著者らは、単に、抗体産生細胞ではない幹細胞で重鎖遺伝子座を改変するためだけに、Cre媒介部位特異的組換えを用

いた。キメラ抗体または改変抗体を産生するために、抗体産生細胞の中に遺伝子配列の新しい組み合わせを作出するために用いたというよりも、この遺伝子座を欠失によって改変するためだけに用いたのである。

ジョンソン (Johnson) らは、PCT国際公開公報第93/19172号 (1993年9月9日公開) において、ウォーターハウス (Waterhouse) らは、雑誌記事、[Nucleic Acids Res (1993) 21:2265~2266]において、ファージベクター内に抗体の組み合

わせライブラリーを作製するための組換えをもたらすために、Cre媒介部位特異的組換えを用いることを説明している。後者の出版物において、ジョンソン、ウォーターハウスおよび共同研究者らは、AとBと名づけられた、2種の例示的ファージベクターについて説明している。ここで、Aは、最初の抗体の軽鎖 (および異なる抗体の重鎖) をコードしており、Bは、最初の抗体の重鎖をコードしている。いずれのベクターにおいても、可変部重鎖 (VH) 遺伝子は、2つのlox部位に隣接しているが、このうち、一つの部位は、変異lox部位で、ベクター内での組換えによって、VH遺伝子が単に切り出されるだけになるのを防ぐ。Creを発現するファージで大腸菌を形質転換することによって、インビボでCreリコンビナーゼが提供されると、ベクターAおよびBは、変異型または野生型のlox部位の間で生じる組換えによって、融合してキメラプラスミドが作出される。そして、さらに、2つの野生型のlox部位または2つの変異型のlox部位の間で組換えを起こすことができ、元のベクターAとBになるか、新しい2種のベクターEとFが作出される。したがって、EとFでは、AとBの重鎖が交換されており、Eには、ファージ遺伝子3蛋白質 (g3p) のN末端に融合した蛋白質として示されるよう最初の抗体のFab断片がコードされている。著者らは、この方法によって、例えば、ファージベクターAの軽鎖レパートリーと、ファージベクターBの重鎖レパートリーとを提供することによって、ファージが発現する抗体の非常に多数の組み合わせレパートリーを作出できるはずである。しかし、これら2つの公開文献は、開示された特殊なバクテリオファージベクターにおいて、重鎖遺伝子の交換以外の目的に、Cre媒介部位特異的組換えを用いることについては開示していない。より具体的には、抗体産生細胞のゲノム中の免疫グロブリンの配列を

改変することについては提示していない。

従って、本発明は、あらゆる抗体産生細胞の細胞内ゲノム中で、免疫グロブリン遺伝子座を改変するためのCre媒介部位特異的組換えの新規な利用を提供する。

発明の開示

本発明は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて免疫グロブリン遺伝子座を改変することによって、ゲノム配列から望ましい抗体を発現する細胞を産生するための処理を目的としている。本方法は特に、遺伝子座を改変するために相同的組換え

のみを用いて、抗体産生細胞の中で直接免疫グロブリン遺伝子座を改変するという従来の方法よりも組換え効率を上昇させるという利点を提供する。

このように、一つの局面において、本発明は、改変された免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を作出する方法を目的としている。本発明に係る方法は、Cre媒介部位特異的組換えを用いており、

(a) インビボでのCre媒介によるゲノムDNAの部位特異的組換えにより、ゲノム配列の中に第一lox部位が挿入されるよう、(i) 第一lox部位と、(ii) 改変された領域に置き換えられるべき免疫グロブリン遺伝子座のゲノム配列領域に隣接した第一のDNA配列と相同的な標的配列とを含む第一の相同性標的ベクターによって、抗体産生細胞を形質転換すること、

(b) (i) 第一lox部位とのCre媒介による組換えに適した第二lox部位と、(ii) 免疫グロブリン遺伝子座の該領域を、改変された配列で置き換えるための改変配列を含むlox標的ベクターによって、該細胞を形質転換すること、

(c) Cre媒介によるlox部位の部位特異的組換えによって、改変配列がゲノム配列の中に挿入され、それによって、免疫グロブリン遺伝子座領域が改変された配列に置き換わるように、lox部位をCreと相互作用させること、および、

(d) 免疫グロブリン遺伝子座領域が改変された領域に変換されておりかつ抗体分子を産生する形質転換体を選抜すること、を含む。

本方法の好ましい態様の一つにおいて、loxを標的とするベクターは、さらに

、細胞の中でマーカー遺伝子が発現されるよう、調節領域に機能的に結合させた選抜用マーカー遺伝子を有する。lox部位をCreと相互作用させると、マーカー遺伝子は、Cre媒介によるlox部位の部位特異的組換えによって、改変配列とともにゲノム配列の中に挿入される。この態様において、形質転換体の選抜には、マーカー遺伝子の発現についての選抜が含まれる。

本発明に係る方法の第二の好ましい態様は、段階(b)の前に、(i) 第一lox部位と第二lox部位とのCreが媒介する組換えに適した第三lox部位と、(ii) 細胞の中で第一のマーカー遺伝子が発現されるように、調節領域に機能的に結合させた第一選抜マーカー遺伝子と、(iii) ゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接する配列で、置き換えられる配列に相同な標的配列とを含む第二の相同

性標的ベクターによって細胞を形質転換することを含む付加的な段階をさらに含む。この態様において、転換される遺伝子は、第一のDNA配列と第二のDNA配列とに隣接している。また、第三lox部位と第一マーカー遺伝子は、ゲノムDNAによるインビボでの部位特異的な相同的組換えによってゲノム配列の中に挿入される。

また、この第二の好ましい態様において、第二の標的ベクターは、第二のマーカー遺伝子が細胞の中で発現されるように、制御領域に機能的に結合させた第二の選抜マーカーをさらに含む。lox部位をCreと相互作用させると、第二のマーカー遺伝子は、Cre媒介による適当なlox部位の部位特異的組換えによって、改変配列とともにゲノム配列の中に挿入される。この態様において、形質転換体の選抜は、第二のマーカー遺伝子の発現を選抜することを含む。本発明に係る方法の、この態様をさらに変化させた態様において、lox部位をCreと相互作用させると、改変配列と第二のマーカー遺伝子とがゲノム配列の中に挿入された後、Cre媒介部位特異的組換えによって第一マーカー遺伝子と転換されるべき配列とが削除され、形質転換体の選抜は、第一マーカー遺伝子を発現していない形質転換体を選抜することをさらに含む。

本発明のいくつかの態様において、改変配列は、免疫グロブリン遺伝子の発現を変更させるために、このゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子の調節配列の全部

または一部を置換する調節塩基配列を含む。別の態様において、改変配列は、免疫グロブリン遺伝子の発現を変更させるために、免疫グロブリン遺伝子のゲノム配列の調節配列の全部または一部を置き換える調節配列を含む。別の態様において、改変配列は、改変された抗体分子を作出するために、抗体分子の定常領域または可変領域のいずれかの全部または一部を置き換えるための翻訳産物をコードする塩基配列を含む。後者の態様のいくつかにおいて、改変領域に転換されるべき免疫グロブリン遺伝子座領域は、定常領域遺伝子を含み、また、改変配列は、定常領域遺伝子によって産生される抗体の該定常領域の全部または一部を、改変された定常領域で置き換えるための翻訳産物をコードする塩基配列を含む。

場合によっては、ゲノム配列の定常領域遺伝子は、ヒトの定常領域遺伝子であり、改変された定常領域遺伝子は、別のヒト定常領域をコードしている。改変された定常領域遺伝子は、軽鎖遺伝子または重鎖遺伝子を含む。改変された定常領

域によって抗体分子を発現する細胞を作出するための、本発明に係る方法のさまざまな態様において、改変された定常領域遺伝子は、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、リンカー、または、改変された重鎖エフェクター機能を有する変異定常領域などをコードする領域を含む。

本発明の方法のいくつかの態様において、抗体分子を発現する細胞は、リンパ様細胞系の細胞である。このリンパ様細胞系は、マウスもしくはヒトの抗体またはキメラ抗体を産生するマウスハイブリドーマ細胞系であってもよい。いくつかの態様において、ハイブリドーマ細胞系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させることによって、ヒト抗体を産生している。特定の態様において、この細胞は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現させることによって、ヒト抗体を産生する、マウスのリンパ系細胞である。この態様に変更を加えた態様において、定常領域遺伝子のゲノム配列は、ミュー (μ) ・クラスのヒトの定常領域 (c) 遺伝子、すなわち、 C_{μ} 遺伝子であり、改変配列は、ヒトのCガンマ (C_{γ}) 定常領域遺伝子を含んでいる。

本発明の別の局面は、改変された免疫グロブリン遺伝子座を有する細胞で、本発明に係る上記の方法によって作出された細胞のゲノム配列由来の抗体を発現す

る細胞を目的としている。

本発明の別の局面は、Cre媒介部位特異的組換えを用いる免疫グロブリン遺伝子座領域の改変に用いるために、抗体分子をコードするこの免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接しているか、またはその中に組み込まれたlox部位を有する細胞のゲノム配列から抗体分子を発現する細胞を産生するための方法である。本方法は、(a) インビボでのCre媒介によるゲノムDNAの部位特異的組換えにより、ゲノム配列の中に第一lox部位が挿入されるよう、(i) 第一lox部位と、(ii) 改変された領域に置き換えられるべき免疫グロブリン遺伝子座のゲノム配列領域に隣接した第一のDNA配列と相同的な標的配列とを含む第一の標的ベクターによって、抗体産生細胞を形質転換することを含む。さらに、本方法は、(b) 改変されるべき領域に隣接したゲノムDNAの中に挿入されたlox部位を有するトランスフェクション細胞を選抜することを含む。この選抜は、インビボでのゲノムDNAのCre媒介部位特異的組換えによって、ゲノム配列の中にlox部位を挿入するために用いられ

たベクターの中の1個以上の選抜マーカー遺伝子を用いて行ってもよい。本発明のこの局面の別の一面は、抗体分子をコードする免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接または包含されたlox部位を有する抗体分子を発現する細胞で、本発明に係る上記の方法によって作出された細胞に関する。

本発明のさらに別の局面は、少なくともヒトの重鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位か、少なくともヒトの軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位を含むゲノムを含む、遺伝子導入した非霊長類哺乳動物の胚幹細胞を目的とする。この幹細胞のゲノムにおいて、lox部位は、該ヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接しているか、その中に取り込まれている。好ましい態様において、この幹細胞は、マウスの幹細胞である。

本発明に関する局面は、少なくともヒトの重鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位か、少なくともヒトの軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の機能的部位を含むゲノムを含む、遺伝子導入した非霊長類哺乳動物である。この幹細胞のゲノムにおいて、lox部位は、該ヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接し

ているか、その中に取り込まれている。好ましい態様において、この遺伝子導入した哺乳動物は、マウスである。

本発明の別の局面は以下に説明されている。

図面の簡単な説明

図1は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作製するための、本発明に係る方法の一つの態様（略図A）の概略図を示している。この略図では、改変されるべき定常領域遺伝子に隣接したlox部位を一個だけ挿入する必要がある。

図2は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作製するための、本発明に係る方法の一つの態様（略図B）の概略図を示している。この略図では、改変されるべき定常領域に続く、抗体産生細胞のゲノム中に組み込まれた2個のlox部位が使用されている。

図3は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作製するための、本発明に係る方法の一つの態様（略図C）の概略図を示している。この略図でも、改変されるべき定常領域遺伝子に隣

接したlox部位を一個だけ挿入する必要がある。しかし、このlox部位は、抗体を発現する細胞が由来する遺伝子導入動物のゲノムの中に挿入されている。

発明の実施の形態

定義

以下の用語は、本明細書で用いられるとき、単数形であろうと複数形であろうと、以下に示す意味を有するものとする。

免疫グロブリン遺伝子座：抗体分子の定常領域もしくは可変領域の全部もしくは一部をコードする塩基配列、または、抗体分子の発現を制御する調節塩基配列の全部または一部。重鎖にあたる免疫グロブリン遺伝子座には、V、D、Jおよび転換領域（イントロンと呼ばれる介在配列が含まれる）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される特定の重鎖定常領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部とが含まれるが、これらに限定されない。また、この

定常領域の内部または下流に位置する配列（イントロンを含む）を含んでもよい。軽鎖にあたる免疫グロブリン遺伝子座には、VとJ領域、その上流隣接領域、または、介在配列（イントロン）で、形質転換される抗体産生細胞によって発現される軽鎖の定常領域遺伝子に結合または隣接した配列の、全部または一部が含まれるが、これらに限定されない。また、この定常領域の内部または下流に位置する配列（イントロンを含む）を含んでもよい。重鎖可変領域にあたる免疫グロブリン遺伝子座には、V、DおよびJ領域（イントロンを含む）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される特定の重鎖可変領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部とが含まれるが、これらに限定されない。軽鎖可変領域にあたる免疫グロブリン遺伝子座には、VおよびJ領域（イントロンを含む）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される軽鎖可変領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部とが含まれるが、これらに限定されない。

改変された抗体：抗体分子において、（a）定常領域またはその一部が、変更、置換または交換されて、抗原結合部位（可変領域）が、異なるクラスもしくは改変したクラスの定常領域、エフェクター機能および/または分子種、または、改変された抗体に、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などの新しい

性質を付与する全く別の分子に結合しているか、（b）可変領域またはその一部が、異なる抗原特異性か、改変された抗原特異性を有する可変領域によって変更、置換または交換されている抗体分子。

改変配列：塩基配列において、（a）抗体分子の定常領域もしくは可変領域の全部もしくは一部を、改変された抗体分子を作製するために改変もしくは置換するための翻訳産物、または、（b）免疫グロブリン遺伝子座配列の改変された発現を提供するために、その免疫グロブリン遺伝子座配列の調節配列の全部もしくは一部を改変もしくは置換するための、1個以上の調節塩基配列をコードする塩基配列。この調節配列には、例えば、プロモーター、エンハンサー、イントロン、転換配列、リボソーム結合部位などが含まれ、抗体分子の領域を置換するため

の翻訳産物をコードする配列に付加したり、代替したりしてもよい。適当な調節配列は、当技術分野において既知である。選択された抗体産生細胞とともに用いられる調節塩基配列は、本発明に係る方法に重要ではない。抗体産生細胞において、免疫グロブリンの配列の発現を改変するのに好ましい調節塩基配列には、マウスのカッパ (κ) 鎖エンハンサー配列、または、モロニーマウス白血病ウイルスカラウス肉腫ウイルスもしくは脾臓フォーカス形成ウイルス (spleen focus forming virus) に由来するプロモーターが含まれる。

改変配列は、抗体産生細胞または胚幹細胞の形質転換に用いられる、本発明に係る組換えDNA標的ベクターの中に挿入される。抗体の定常領域の全部または一部を改変するために、本発明に係る改変配列には、特定のエフェクター機能、クラスおよび/もしくは起源 (例えば、ヒト免疫グロブリンまたは他の種のIgG、IgA、IgM、IgDまたはIgEの定常領域) を有する定常領域、または免疫グロブリンの定常領域の活性もしくは性質を改変する定常領域の一部が含まれるが、これらに限定されない。すなわち、改変された抗体分子に、例えば、酵素、毒素、生物学的に活性のあるペプチド、成長因子、阻害因子、結合可能なペプチドリンカーなど、何らかの新しい機能をもたらす別の分子をコードする遺伝子も含まれる。抗体の可変領域の全部または一部を改変するために、本発明に係る改変配列には、結果的に改変された抗体が、抗原に対する親和性もしくは特異性の程度がより高くなるような、異なる抗原親和性や特異性を有する別の可変領域、または免疫グロ

ブリンの可変領域もしくは活性や性質を改変する可変領域の一部をコードする免疫グロブリンの可変領域が含まれるが、これらに限定されない。

選択される改変配列は、発現される改変抗体分子が何に使用されるかに一部依存する。例えば、ヒトの治療に用いようとするのであれば、改変配列は、ヒトの定常領域、好ましくは、標的腫瘍細胞を傷害するための毒素など、治療用に用いることを念頭に置いた望ましいエフェクター機能を有するクラスの領域をコードする。抗体の現存するエフェクター機能を改善または変更することが望ましければ、改変された抗体分子に改善または変更されたエフェクター機能を付与する配

列で、定常領域の一部を置換してもよい。例えば、画像化または標的細胞に細胞毒性薬を輸送するために抗体を用いるときのように、循環系から抗体が浄化される率を減少させるのが望ましいときは、ヒト γ_2 重鎖領域の一部を、 γ_2 重鎖がFcレセプターに結合しなくなった変異配列を含む γ_2 重鎖領域からの領域で置換してもよい。

酵素、毒素、薬物、ホルモン、または成長因子などの標的を定めたインビボでの輸送が望ましいときは、酵素、毒素、薬物、ホルモンもしくは成長因子、またはそれに結合させるための適当なリンカーをコードする改変配列が用いられる。改変された抗体を診断アッセイに用いようとするときで、例えば、標識抗体を利用するときなどは、酵素またはその基質をコードする改変配列を用いることができる。このような酵素/基質システムには、例えば、ベーターガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュ・パーオキシダーゼなど、反応したときに着色した産物が産生されるシステムが含まれる。この結果できた改変抗体は、例えば、酵素、毒素、薬物、ホルモンもしくは成長因子などの化学的付加などのさらなる修飾を加えるか、またはそのまま、処理過程の中で標識抗体として用いることができる。

抗体の可変領域を転換するために用いられる改変配列には、望ましい抗原を認識する抗体分子の可変領域をコードする配列の全部または一部が含まれる。これらは、関連した抗原または全く無関係な抗原を認識する抗原結合領域をコードしていてもよい。抗原結合性または抗原特異性を改善または改変したいときは、そのような改善または改変された抗原結合性または抗原特異性を改変された抗体

分子に付与する配列で、可変領域の一部を置き換えてもよい。また、本発明に係る方法は、双特異的抗体を産生する細胞を構築するのに有用である。双特異的抗体とは、軽鎖および/または重鎖遺伝子の中に、別個の可変領域を2つ含むように細胞を改変して、2つの異なる可変領域を有するようになった抗体である。これに関連して、野生型で非親和性の変異lox部位が同じゲノムの中に取り込まれると、例えば、ジョンソン(Johnson)らが、PCT国際公開公報第93/10172号で説明しているように、望ましい組み込み部位に親和性のある部位を有するベクターを

用いて、これらの部位のいずれかに、特定の改変配列が選択的に挿入される。

Cre: cre遺伝子の酵素発現産物で、lox部位（後述の定義を参照のこと）でDNAの部位特異的組換えを起こさせるリコンビナーゼ。cre遺伝子の一つは、当技術分野において既知の方法によって、バクテリオファージP1から単離することができる。この方法は、例えば、アブレムスキー (Abremski) らが「Cell, 32:1301~1311(1983)」において開示しており、この開示は、本明細書に参照として完全に包含される。

Lox部位: 本明細書において「Cre」として言及されるcre遺伝子の遺伝子産物が、部位特異的な組換えを媒介できる、ヌクレオチド配列。LoxP部位は、当技術分野において既知の方法によって、バクテリオファージP1から単離することができる、34塩基対のヌクレオチド配列である。LoxP部位をバクテリオファージP1から単離するための方法の一つは、「ヘス (Hoess) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:3398(1982)」に開示されており、その開示は、本明細書に参照として完全に包含される。LoxP部位は、8塩基対のスペーサーで隔てられた13塩基対の逆方向の反復配列を含む。このLoxPの逆方向の反復配列とスペーサー領域の塩基配列は以下の通りである。

ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAAGTTAT

この他の適当なlox部位には、大腸菌から単離された塩基配列である、LoxB、LoxLおよびLoxRが含まれる。これらの塩基配列は、「ヘス (Hoess) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:3398(1982)」に開示、説明されており、この開示は、本明細書に参照として完全に包含される。好ましくは、lox部位は、LoxPまたはLoxC2である。LoxC2の逆方向の反復配列とスペーサー領域の塩基配列は以下の通りで

ある。

ACAACCTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT

ジョンソン (Johnson) らは、本明細書に参照として完全に包含されるPCT国際公開公報第93/10172号において、VH遺伝子が2つのlox部位に隣接しているファージベクターを説明している。この2つのlox部位の一つは、LoxPのスペーサー領域

の7番目のGがAに置換された変異LoxP部位 (LoxP 511) で、これによって、ベクター内の組換えによって、単にVH遺伝子だけが切り出されるのを防ぐことができる。しかし、2つのloxP 511部位は、Cre媒介による組換えによって、組み換わるのが可能であるため、野生型のlox部位が1個以上あれば、選択的に組換わることができる。このLoxP 511の逆方向の反復配列とスペーサー領域の塩基配列は以下の通りである。

ATAACTTCGTATA ATGTATAC TATACGAAAGTTAT

当技術分野において既知の、さまざまな合成技術によって、Lox部位を作製することができる。例えば、lox部位を作出するための合成技術は、「イトウ (Ito) ら、Nuc. Acid. Res., 10:1755(1982)」および「オギルビー (Ogilvie) ら、Science, 214:270(1981)」に開示されており、これらの開示は、本明細書に参照として完全に包含される。

Cre媒介部位特異的組換え：2つの親和性のあるlox部位の間における組換え処理には、以下の3つの過程のいずれかが含まれる；

1. lox部位に隣接する、予め選択されたDNA断片の削除、
2. lox部位に隣接する、予め選択されたDNA断片の塩基配列の逆転、および、
3. 別のDNA分子に位置するlox部位のすぐ近くにあるDNA断片の相互交換。いずれかまたは双方のDNA分子が環状であれば、このDNA断片の相互交換によって組み込み現象がもたらされる。したがって、本発明によって、lox標的ベクターを用いて、ベクターの中のlox部位と組換えを起こすのに適したlox部位を1個有する抗体産生細胞のゲノムの中に改変配列を挿入する（すなわち、組み込む）ときには、このような場合のlox標的ベクターは環状のDNA分子であることを理解すべきである。lox部位に隣接した直鎖状のDNAセグメントも、隣接するlox部位の間での組換えによって、lox部位を1個含むDNA分子の中に挿入することもできる。

標的配列：細胞のゲノム中の配列において、変換されるべき免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接するか、その近傍にあるゲノム中の配列と相同な配列。隣接または近傍の配列は、その遺伝子座自体の内部または抗体産生細胞のゲノム中のコ

ーディング発現の上流もしくは下流にあるかもしれない。標的配列は、抗体産生細胞を形質転換するために用いられる組換えDNAベクターの中に挿入され、それによって、lox部位の配列など、細胞のゲノムの中に挿入されるべき配列がベクターの標的配列に近接するようになる。

抗体産生細胞または胚幹細胞に関して、重鎖を組換えるための標的配列で、定常領域の全部または一部の中で、置換や挿入を誘発する標的配列には、V、D、Jおよび転換領域（イントロンと呼ばれる介在配列が含まれる）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される特定の重鎖定常領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部とが含まれるが、これらに限定されない。また、この定常領域の内部または下流に位置する配列（イントロンを含む）を含んでもよい。軽鎖を組換えるための標的配列で、定常領域の全部または一部の中で、置換または挿入を誘発する標的配列には、VとJ領域、その上流隣接領域、または、介在配列（イントロン）で、形質転換される抗体産生細胞によって発現される軽鎖の定常領域遺伝子に結合または隣接した配列の、全部または一部が含まれるが、これらに限定されない。また、この定常領域の内部または下流に位置する配列（イントロンを含む）を含んでもよい。重鎖を組換えるための標的配列で、可変領域の全部または一部の中で、置換または挿入を誘発する標的配列には、V、DおよびJ領域（イントロンを含む）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される特定の重鎖可変領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部が含まれるが、これらに限定されない。軽鎖を組換えるための標的配列で、可変領域の全部または一部の中で、置換または挿入を誘発する標的配列には、VおよびJ領域（イントロンを含む）と、形質転換される抗体産生細胞によって発現される軽鎖可変領域遺伝子に結合または隣接した隣接配列の全部または一部が含まれるが、これらに限定されない。

本発明に係る相同的組換えベクターに関する標的配列は、通常、ゲノムDNAに結合した標的配列の部位特異的な相同的組換えによって、ゲノム配列の中にlox部位

がインピボで挿入されても、形質転換細胞によって発現される抗体分子のアミノ

酸配列が改変されないようなものが、上記のベクターからさらに選択される。このようにすれば、免疫グロブリン遺伝子の転写と翻訳が適正に維持され、lox部位（また、場合によっては、選抜マーカーなどの付加的な配列）を挿入した後に、望ましい抗体が産生される。ところで、いくつかの場合には、挿入によって抗体分子のアミノ酸配列は変化するが、望ましい目的については十分な機能を抗体が保持するようにして、lox部位と他の配列を免疫グロブリン遺伝子座の配列の中に挿入することができる。例えば、「ウォーターハウス (Waterhouse) ら、Nucleic Acids Res. (1993)21:2265~2266」は、本明細書に参照として完全に包含されるが、34塩基対のlox部位によってコードされるアミノ酸配列を通してファージ蛋白質に結合したIgMまたはIgGのポリペプチド鎖をコードするDNA配列を説明している。この構築物は、ファージ粒子が機能的な抗体結合部位を提示するように、ファージ蛋白質に融合した抗体の可変領域を産生する。機能的な抗体領域を、毒素などの別のペプチドに結合させてもよいが、その場合には、lox部位によってコードされたアミノ酸配列を通して、そのポリペプチドに結合した、IgMまたはIgGのポリペプチド鎖をコードするDNA配列を含む、これらの構築物またはそれらに類似の構築物を用いる。

ベクター：自己複製するか否かに関わらず、抗原産生細胞を形質転換するために用いることのできるプラスミドもしくはウイルス、またはDNA分子もしくはRNA分子が含まれる。

相同性標的ベクター：標的配列と他の配列、特に、lox部位と、場合によっては、選抜マーカー遺伝子とを含む組換えDNAまたはRNAベクターで、相同性標的ベクターによって形質転換された抗体産生細胞または胚幹細胞の中で、相同性が媒介する部特異的な組換えを用いて免疫グロブリン遺伝子座を改変するために用いられるベクター。相同性標的ベクターは、望ましい相同的組換えが起こるのを促進するために、直鎖状のDNA分子の形で、典型的には、抗体産生細胞に形質導入される。

Lox標的ベクター：標的配列と他の配列、特に、lox部位と、場合によっては、選抜マーカー遺伝子とを含む組換えDNAまたはRNAベクターで、抗体産生細胞の中

で、Cre媒介部位特異的組換えを用いて免疫グロブリン遺伝子座を改変するために用いられるベクター。Lox標的ベクターのlox部位は、抗体産生細胞または胚幹細胞のゲノム配列の中に（相同性標的ベクターによって）、改変配列によって変更しようとしている免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接して挿入されている別のlox部位と、Cre媒介による組換えを行うのに適している。抗体産生細胞または胚幹細胞のゲノム中の免疫グロブリン遺伝子座の領域にある単独のlox部位の中に、改変配列を組み込むと、改変配列が付加されることによって、この領域の改変がもたらされる。改変されるべき領域に近接した2つのlox部位を含むゲノムの中に、改変配列を組み込むと、この領域は改変配列によって置換される。

抗体産生細胞：ベクターの標的配列に相同な配列を含み、（a）望ましい抗原特異性と親和性、（b）望ましい定常領域、または、（c）高分泌水準、大量培養適応性など、その他の望ましい性質を有する免疫グロブリン分子を産生することができる細胞を形質転換するために、相同性標ベクターとLox標的ベクターとが用いられる。このような細胞には、望ましい特異性、親和性またはエフェクター機能を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに由来する細胞系、または、免疫グロブリンの重鎖および/または軽鎖の発現を阻害する変異をハイブリドーマ自体が保持しているハイブリドーマ細胞が含まれるが、これらに限定されない。

本発明の、ある好ましい態様において、例えば、クーカーラパティ（Kucherlapati）らによって、PCT国際公開公報第91/10741号（1991年7月25日公開）およびPCT国際公開公報第94/02602号（1994年2月3日公開）において説明されているように、抗体産生細胞は、ヒト免疫グロブリンの重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子が組み込まれたマウスのB細胞に由来するハイブリドーマである。このようなマウスは、ヒト抗原など、マウスの免疫系によって正常に認識される抗原による免疫に応答して、ヒト抗体を産生する。このため、これらのマウスからのB細胞を用いて、ハイブリドーマを産生するための定法によって、ヒトのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出することができる。このような遺伝子導入マウスからのハイブリドーマを用いる特定の態様において、遺伝子導入マウスにおけるヒトの免疫グロブリン遺伝子座を含むゲノム配列は、さらに、本発明に係る方

法に

よって、ハイブリドーマの中で改変されるべき免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接するか、その中に挿入されたlox部位を含む。例えば、クーカーラパティ (Kucherlapati) ら (前記) によって説明されているように、このlox部位は、マウスの胚幹細胞のゲノムの中に挿入される前に、遺伝子導入マウスが作られる胚幹細胞のゲノムの中にヒトの免疫グロブリン遺伝子座を挿入するために用いられるベクターの中に取り込まれることによって、ヒト免疫グロブリン遺伝子座に隣接するか、またはその中に挿入される。本発明の方法によって、遺伝子導入マウスから得た抗体産生細胞の中で最終的に改変されるべき免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接するか、またはその中に挿入して、lox部位を、従来の組換えDNA法を用いてこのベクターに取り込む。

さらに、抗体を作製するための本発明の方法を実施するのに適した抗体産生細胞には、本明細書に参照として完全に包含される米国特許第4,816,567号においてキャビリー (Cabilly) らにより開示されているように、原核生物および真核生物の両方の宿主が含まれる。

次の略語は、以下に示す意味を有するものとする。

DHFR : ジヒドロ葉酸リダクターゼ

gpt : グアノシン・ホスフォリル・トランスフェラーゼ遺伝子

Neo : ネオマイシン耐性遺伝子

Hyg : ハイグロマイシン耐性遺伝子

免疫グロブリン遺伝子座を改変するための発明の方法

本発明は、抗体を産生するリンパ系細胞において、抗体遺伝子の定常領域を、別のクラスの定常領域で置き換えることによって、インサイチューで抗体遺伝子のクラス転換を行い、それによって、変換された、すなわち、「転換された」アイソタイプを産生するように、免疫グロブリン遺伝子座を改変するための、Cre媒介部位特異的組換えの新しい使用に関する。この結果生じる細胞を、改変された抗体を大量に生産するために用いることができる。より特定すると、本発明は、抗体産生細胞の免疫グロブリン遺伝子座のゲノム配列中の望ましい位置で、標

的遺伝子を改変するために、Cre媒介部位特異的組換えを用いて、改変された定常領域を有する改変抗体分子を発現する細胞、または改変された抗体分子を発現する

リンパ様細胞系を産生するための方法を提供する。

本発明の方法において、まず、相同的組換えによって、1個以上のlox部位を含むDNA配列が抗体産生細胞のゲノムの中に導入される。lox部位の挿入は、抗体産生細胞の、改変領域となるよう改変される免疫グロブリン遺伝子座領域に隣接している。次に、組み込まれたlox部位を1個以上有するゲノムを含む細胞を、

(a) 組み込まれたlox部位による、Cre媒介部位特異的組換えに適したlox部位と、(b) 改変配列とを含むDNA分子で形質転換する。そして、ゲノムのlox部位とベクターのlox部位を、Creリコンビナーゼと相互作用させ（典型的には、プラスミドからリコンビナーゼを一過性発現させて）、それにより、lox部位のCre媒介部位特異的組換えによって、改変配列がゲノム配列の中に挿入されるように、lox部位間で組換えが起こり、その結果、ゲノム配列の望ましい部位を改変配列に変換する。

本方法において、lox部位とCreとの相互作用は、典型的には、プラスミドからリコンビナーゼを一過性発現させることにより行う。Cre媒介による組換えを幾度も行くと、構築物から望ましくない欠失が起こりがちであるので、複数のlox部位を含む構築物を生じるような、限られた数の組換えを実験の対象が生じさせなければならないときには、Creとの一過的な相互作用が特に好ましい。

本発明に係る方法を用いて、適当な「相同性標的ベクター」および「lox標的ベクター」による抗体産生細胞の形質転換と、Creリコンビナーゼによるlox部位の相互作用とによって、抗体分子のアミノ酸配列を改変することができる。本発明の一つの態様において、望ましい抗原特異性または親和性をコードする免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞系を、lox部位と「改変配列」をコードする組換えDNA分子を含む、本発明に係るlox標的ベクターで形質転換する。改変配列は、抗体産生細胞によって発現される抗体分子の定常領域の全部または一部を置き換える望ましい分子をコードする。この態様に関する改変配列の実施例は、上述され

ている。

この態様において、lox部位は、形質転換される細胞系によってコードされている免疫グロブリンの定常領域に対する成熟した遺伝子コード配列の中、または、それに隣接した染色体に見られるDNA配列に対して、「標的配列」が相同である相

同性標的ベクターを用いて、抗体産生細胞のゲノムDNAの中に組み込まれる。形質転換後、抗体産生細胞の中で相同的組換えが起こる。そして、これらの組換え事象のいくつかによって、lox部位が、抗体産生細胞のゲノムDNAの中の望ましい位置に組み込まれる。この後、lox標的ベクターと、1個以上の組み込まれたlox部位との間で、Cre媒介部位特異的組換えが起きることによって、lox標的ベクターの改変配列が、免疫グロブリン遺伝子座の定常領域の全部または一部に置換され、これによって、形質転換された細胞による改変された抗体分子の発現がもたらされる。定常領域遺伝子が置換される範囲（すなわち、全部か一部か）は、当然、細胞の免疫グロブリン遺伝子座の中に組み込まれたlox部位の位置およびlox標的ベクターの中の改変配列の性質による。

本発明の別の局面において、望ましい定常領域をコードする免疫グロブリン遺伝子座を含むリンパ様細胞系は、改変されるべきゲノムの可変領域に隣接したlox部位を挿入するために、相同性標的ベクターによって形質転換され、その後、望ましい抗原特異性または親和性を有する可変領域の全部または一部をコードする改変配列を含むlox標的ベクターで形質転換される。形質転換をして、lox部位とCreを相互作用させた後、リンパ様細胞系の中で、Cre媒介部位特異的組換えが起こり、これらの組換え事象のいくつかによって、改変配列による、免疫グロブリン遺伝子座の可変領域の全部または一部の置換が起き、その結果、形質転換された細胞による改変抗体分子の発現がもたらされる。

改変された抗体を発現させる形質転換細胞がいったん同定されたら、本発明の実施は、形質転換細胞を培養することと、モノクローナル抗体を単離するための、当技術分野において周知の技術を用いて、細胞培養上清から改変された抗体を単離することとに関する。または、当技術分野において周知の技術を用いて、動

物の腹水の中で形質転換細胞を培養して、回収してもよい。

抗体産生細胞の免疫グロブリン遺伝子座における改変で、本明細書において説明されている改変のすべては、まず、本発明に係る相同性標的ベクターで抗体産生細胞を形質転換することによって、この抗体産生細胞のゲノムの中にlox部位を導入して行われる。しかし、生殖系のDNAに組み込まれたlox部位を有する遺伝子導入マウスからB細胞のハイブリドーマを作製することによって、本発明において

て使用するのに適したlox部位を含むゲノムを有する抗体産生細胞を作出することもできる。これらのマウスは、本明細書において参照として完全に包含されるPCT国際公開公報第91/10741号（1991年7月25日公開）およびPCT国際公開公報第94/02602号（1994年2月3日公開）において、クーカーラパティ（Kucherlapati）らによって、説明されているような方法によって作製される。このような遺伝子導入マウスを、遺伝子導入マウスを作出するための別の方法で、当技術分野において既知の方法によって作出してもよい。一般的に、遺伝子導入マウスを作出するために用いられる胚幹細胞は、ヒト免疫グロブリンの重鎖遺伝子と軽鎖遺伝子とを含む構築物で、さらに、これらの遺伝子導入マウスから採取した抗体産生細胞の中で最終的に改変されるべきヒト免疫グロブリン遺伝子座領域（例えば、重鎖遺伝子）に隣接するか、その中に組み込まれたlox部位を含む構築物を用いて定法によって形質転換される。抗体産生細胞は、例えば、ハイブリドーマを作出する定法によって、遺伝子導入マウスから採取する。

lox部位を挿入するための相同性標的ベクター

本発明に係る方法において、例えば、本明細書において参照として完全に包含される、1993年4月13日公開の米国特許第5,202,238号で、フェル(Fell)らによって説明されているような、相同的組換えによって遺伝子を挿入するための既知の方法を用いた、相同性を標的とした部位特異的組換えによって、lox部位を含むDNA配列を、抗体産生細胞または胚幹細胞のゲノムの中に、まず導入する。本発明の方法において、抗体産生細胞または胚幹細胞のゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子座領域で、改変された領域として最終的には変換されるべき領域に隣接

して、lox部位が挿入される。

本発明の標的ベクター（すなわち、相同標的ベクターまたはlox標的ベクター）には、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、ウイルスなどが含まれるが、これらに限定されない組換えDNAベクターで、lox部位および/または改変配列および/または標的配列を含む組換えDNAベクターが含まれる。上記で、より詳細に説明されているように、改変配列は、多数ある調節領域のいずれか、または望ましい構造遺伝子産物をコードする遺伝子を含み、一方、標的配列は、変換される抗体分子のタイプおよび形質転換される細胞型によって多様である。本発明

に係る標的ベクターは、形質転換細胞のスクリーニングおよび選抜を補助するための薬剤耐性を付与する酵素を含む選抜マーカーで、それだけに限定されない選抜マーカーをコードする付加的な遺伝子を含んでいてもよい。または、本発明に係るベクターを、このようなマーカーと同時形質転換してもよい。

組換え事象の発生を促進するその他の配列には、相同標的ベクターも含まれる。このような遺伝子には、RecA、トポイソメラーゼ、RecIなどの、真核生物もしくは原核生物の組換え酵素、または、その他のDNA配列で、Chi（カイ）配列のように組換えを促進するDNA配列が含まれる。さらに、相同的組換えによって作出されたキメラ遺伝子の転写を促進する配列も、本発明に係るベクターに含まれる。すなわち、これらの配列には、メタロチオネイン・プロモーターなどの誘導可能な要素が含まれるが、これに限定はされない（Brinsterら、1982, Nature 296:39~42）。前述の遺伝子によってコードされているような様々な蛋白質も、組換え頻度を上昇させるために導入することができる。

抗体を改変するために、標的配列の組成物は、軽鎖または重鎖のいずれの、可変領域または定常領域遺伝子のいずれの全部または一部を置換するために相同標的ベクターが用いられるかによって、また、さらに、形質転換される宿主細胞の種類によっても変化する。より特異的には、標的配列は、定常領域もしくは可変領域をコードする領域、または、その領域の一部で、置換または変更されるべき領域に隣接するか近接した配列に相同である。

例えば、脊椎動物の染色体において、成熟した重鎖遺伝子は、その5' 端に、VDJ領域を含む。すなわち、可変領域(V)、多様性領域(D)、ジョイニング領域(J)、その後に、発現されないJ領域の残りの領域(J領域の数は種類によって多様である)、および、イントロン配列を含む。この遺伝子の中央部と3' 側部位は、定常領域のエクソン(イントロンおよび非翻訳配列の近傍にあり、散在している)で、さまざまなクラス(例えば、ミュー、デルタ、ガンマ、イプシロン、アルファ)の一つであり、それぞれが、独自の隣接転換領域に結合している定常領域のエクソンを含む。したがって、抗体産生細胞の重鎖遺伝子の中での相同的組換えによるlox部位の挿入を目的として用いられる標的配列は、lox部位を挿入するのに望ましい位置によって、抗体遺伝子のいずれかの部位に相同

な領域を含むかもしれない。例えば、重鎖の定常領域の置換を誘発するためにlox部位を挿入するための標的配列は、V、DまたはJで始まる転換領域のいずれかまで広がっており、それらを含む配列または含まない配列に相同な配列を含み、また、それにより、標的ベクターの構築物の中に置かれる。例えば、改変配列のコーディング領域の5' 側の位置などに置かれる。実際に用いられる標的配列は、標的宿主細胞の種類、標的宿主細胞によって発現される抗体のクラスによって多様である。

いくつかの応用において、lox部位は、Cre媒介部位特異的組換えを用いた、最終的に改変されるべき抗体のアミノ酸配列の改変を伴わない相同的組換えによって、ゲノム配列中に挿入される。抗体産生細胞の成熟重鎖遺伝子に関連する場合には、lox部位は、これらの遺伝子の適当な位置にある非翻訳部位の中に挿入すればよい。例えば、挿入によって望ましい重鎖分子の発現が損なわれないことを条件として、5' 末端については、発現されないイントロン配列であるJ領域の残りの領域、また、遺伝子の中央部および3' 側部位では、定常領域のイントロンおよび非翻訳配列の中に挿入すればよい。

染色体の中の重鎖抗体遺伝子の配置とは対照的に、成熟軽鎖遺伝子は、その5' 端のVJ領域、イントロン領域、および1個の定常領域エクソンを含む。したがって、抗体産生宿主細胞の軽鎖遺伝子の中での相同的組換えによる、lox部位

の挿入に用いられる標的配列は、望ましい改変に応じて、遺伝子のいずれかの部位に相同な領域を含んでいてもよい。例えば、軽鎖定常領域の置換を誘発するための標的配列は、軽鎖の定常領域のコード領域の前にあるイントロン配列から適当なVおよびJの全部または一部にまで延びている配列に相同であってもよい。このような標的配列は、相同性標的プラスミドの中の適当な位置に置かれている。つまり、例えば、軽鎖の定常領域のコード領域の前にあるイントロン配列の中など、lox部位の5'側の位置で、lox部位が軽鎖遺伝子の非翻訳配列の中に組み込まれるような位置に置かれている。再言すると、標的配列の実際のヌクレオチド配列は、標的宿主の抗体産生細胞の動物種によって様々である。

同様の方式で、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域をCre媒介によって置換するためにlox部位の挿入を誘発するための標的配列は、可変領域に近接する適当な領域

の全部または一部に相同な配列を含んでいるかもしれない。いずれの場合にも、標的配列は、エクソンの中にある区域に近接したコード領域の配列で、可変領域または定常領域一部だけを置換して、発現される蛋白質が望ましい態様に変更されるようにした配列を含みうる。

Cre媒介部位特異的組換えの使用

本発明に係る抗体作製法において、1個以上のlox部位をゲノムに含む細胞は、lox標的ベクター、すなわち、典型的には、組み込まれたlox部位によってCre媒介部位特異的組換えをするのに適したlox部位を含むDNA分子で形質転換され、次に、このlox部位をCreリコンビナーゼと相互作用させて、それによって、lox部位での組換えを起こさせる。本明細書において説明され、またより完全にはサウアー (Sauer) ら、米国特許第4,959,317号によって説明されているように、lox部位の位置と方向性によって、組換えの性質が決定される。サウアー (Sauer) ら、米国特許第4,959,317号は、本明細書において、参照として完全に包含される。

lox部位、標的配列および改変配列に加えて、本発明に係る、さまざまな標的ベクターは、うまく形質転換した抗体産生細胞をスクリーニングしたり、選抜し

たりするのに有用な選抜マーカーをコードしていてもよい。適当な選抜マーカー遺伝子には、hyg、gpt、neo、DHFR（上記「略語」のところで定義されている）などの薬剤耐性遺伝子が含まれる。

抗体産生細胞にDNA配列（例えば、lox標的ベクターまたは相同標的ベクター）を導入するための方法は、当技術分野において知られている。これらの方法には、典型的には、1個または一定の数の抗体産生細胞のDNAの中に配列を導入するために、DNAベクターを使用することと、次に、この細胞を増殖させて、適当な細胞集団を作成することが含まれる。好ましくは、DNA配列は、DNA発現を有する一方で、選択された真核細胞を形質転換することが可能なプラスミドによって導入される。選択された抗体産生細胞にDNA配列を導入するために用いられる個々のベクターは重要ではない。

好ましい態様において、グラハム(Graham)およびヴァンデルエブ(van der Eb) (Virology, 52:456~467(1973))によって説明されたCaPO₄（リン酸カルシウム）導入処理によって、DNA配列を哺乳動物の細胞の中に導入する。「グラハム（

Graham)およびヴァンデルエブ(van der Eb)Virology, 52:456~467(1973)」は、参照として完全に本明細書に包含される。特に、リンパ様細胞系の形質転換は、当業者に既知の方法で、リン酸カルシウム沈澱法、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合等を含むが、これらに限定されない幾つかの方法のいずれかによって行うことができる。相同的組換えを行う場合、形質転換細胞の中で相同的組換えが起こる確率を上げるために、形質転換の前に、標的配列を制限酵素で切断することによって、相同標的ベクターを直鎖状にすることができる。

好ましい方法において、lox部位と相互作用させるために、Creを導入し、それによって、部位特異的なCre媒介による組換えを作出する。一つの態様において、マイクロインジェクションによって、Creを直接導入する。好ましい態様において、調節塩基配列の制御の下で、cre遺伝子を抗体産生細胞に導入する。適当な調節塩基配列は、当技術分野において既知である。選択された抗体産生細胞に用いられる調節塩基配列は、本発明の方法に重要ではない。哺乳動物細胞に関す

る適当な調節塩基配列のリストの一部には、「ブロホリンガー(Blochlinger)およびディゲルマン(Diggelman)、Mol. Cell. Bio., 4:2929~2931(1984)」によって説明されているモロニー肉腫ウイルスのLTR(長い末端反復配列) ; 「パブラキス(Pavlakakis)およびハマー(Hamer)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:397~401(1983)」によって説明されているメタロチオネイン-1(MT-1)プロモーター ; 「ゴーマン(Gorman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6777~6781(1982)」によって説明されているラウス肉腫ウイルスのLTR(長い末端反復配列) ; ならびに、「サザン(Southern)およびバーグ(Berg)ら、J. Mol. Appl. Genet., 1:327~341(1982)」によって説明されているSV40の初期領域プロモーターが含まれる。サウアー(Sauer)らは、米国特許第4,959,317号において、哺乳動物の細胞の中でCreを発現させるためのプラスミドで、cre遺伝子の5'上流がMT-1プロモーターに由来するプラスミドPBS31について説明している。CdCl₂(塩化カドミウム)によるMT-1プロモーターの活性化は、このベクターで形質転換された細胞において、cre遺伝子の発現をもたらす。

lox部位は非対称の塩基配列であるため、同じDNA分子にある2つのlox部位は

お互いから見て、同じまたは反対の方向性を有することができる。同じ方向性を有するlox部位の間で起こる組換えにより、2つのlox部位の間に位置するDNAセグメントの欠失と、その結果生じる、元のDNA分子の末端同士の間で結合が起こる。削除されたDNAセグメントは、環状DNAを形成する。元のDNA分子とこの結果できた環状分子は、それぞれ、1個ずつlox部位を有する。同じDNA分子上で反対の方向性を有するlox部位の間での組換えは、この2つのlox部位の間に位置するDNAセグメントの塩基配列の逆位をもたらす。さらに、2つの異なるDNA分子にあるlox部位に最も近いDNAセグメントの相互交換が起こることがあり、2つの新しい組換えDNA分子ができる。これらの組換え事象はすべて、cre遺伝子の遺伝子産物によって触媒される。

組換え細胞のスクリーニングおよび選抜

標的遺伝子改変が成功したか否かについての最終的な試験は、その細胞によっ

て改変抗体が産生されるか否かである。適正に組み込まれたベクター配列を用いて、組み込まれた配列の性質に応じたいくつかの方法で、形質転換細胞の検出を行うことができる。標的ベクターが、選抜マーカールを含んでいる場合には、形質転換細胞の最初のスクリーニングは、マーカールを発現する形質転換細胞を選抜することである。例えば、薬剤耐性遺伝子を用いた場合、最初のスクリーニングで、薬剤耐性遺伝子をもたなければ致死性となる薬剤を含む選抜用培地で増殖する形質転換細胞を同定することができる。そして、2回目のスクリーニングでは、相同標的ベクターのlox部位か、lox標的ベクターの改変配列を組み込んだ形質転換細胞を同定する必要があるが、ここでは、後者の細胞が改変された抗体を発現させる。

2回目のスクリーニングのプロトコールは、挿入された配列の性質に依存する。例えば、サウアー (Sauer) ら、米国特許第4,959,317号などによって説明されているように、単離した細胞のDNAを、インビトロでCreと一緒に処理して、その後、適当な制限酵素を用いてサザンブロット解析を行って、組み込まれたlox部位を検出する。または、組み込まれたlox部位を含むと考えられる特定の遺伝子領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅して、従来の方法によって、増幅されたDNAにlox部位が存在することを (例えば、サイズまたは配列によって) 調べて、相

同標的ベクターで形質転換した細胞にlox部位の挿入があったか否かを調べる。さらに別の代替的な方法において、本発明のlox標的ベクターが有する改変配列が正しく組み込まれる効率を調べることによって、間接的にlox部位の挿入が明らかにされる。

異なる抗体クラスまたは抗体種の定常領域をコードする改変配列の発現は、例えば、特定の免疫グロブリンのクラスおよび/または種類に特異的な抗体を用いる免疫アッセイによって検出される。または、改変配列によって付与される特定のエフェクター機能を試験するためのバイオアッセイを行う。酵素、毒素、成長因子、その他のペプチドなどの生物学的活性のある分子をコードする改変配列の発現を、その特定の生物学的活性について測定する。例えば、適当な酵素基質を用

いたり、毒素、成長因子、ホルモンなどに対する標的物質を用いて、形質転換細胞の産物を調べる。または、改変配列産物に特異的な抗体を用いて、これらの改変配列産物を免疫学的に測定する。

米国特許第5,202,238号で、フェル(Fell)らによって開示された方法を修正したものにしたがって、lox部位を組み込んだ抗体産生細胞を、前述されたところにしたがって、ヒトの定常領域配列を含むlox標的ベクターで形質転換した後、フラスコに入れた選抜培地で1回培養する。十分な選抜が行われる期間（通常は、約2週間）が経過した後、リシンなどの毒素を結合した抗体産生細胞によって元来産生された免疫グロブリンのどの定常領域にも特異的な抗体によって、生き残った細胞を処理する。形質転換に成功しなかった細胞は、マウスの定常領域配列を含む抗体を発現し続けるため、抗マウス免疫グロブリン抗体に結合した毒素によって壊される。望ましいヒト定常領域の配列を含む改変抗体を発現する細胞は、生き残って、次に、軟寒天中で培養され、さらに、抗ヒト免疫グロブリン抗体の塗布によって同定される。

また、改変配列を発現させる形質転換細胞を試験して、例えば、フェル(Fell)ら(前記)、または、カポン(Capon)ら(前記)によって開示されているような、慣習的な免疫学的結合法によって、適正な抗原またはリガンド認識があるかを調べる。その抗体遺伝子が本来改変されているはずの細胞が、機能的な抗体を産生できなければ(例えば、軽鎖だけしか産生できないなど)、本発明に係る標的ベ

クターで形質転換した後には、CDC、ADCCまたは免疫沈澱反応などを含むがこれらに限定されない方法で、機能性の抗体を同定するための、当技術分野において既知の解析方法によって、有用な形質転換細胞が同定される。

以下の実施例は、例示を目的とするものであり、本発明を制限するものではない。

実施例1

マウスハイブリドーマで産生されるヒト抗体の「クラス転換」

図1は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作製するための、本発明に係る方法の一つの態様(略

図A)の概略図を示している。改変されるべき細胞は、ヒト定常領域遺伝子で、改変定常領域に置き換えられる遺伝子を含むゲノムを有するリンパ様細胞系(ハイブリドーマ)に由来する。このような細胞系は、例えば、フェル(Fell)ら(前記)により説明されているような相同的組換え法を用いて組み込まれているヒト定常領域遺伝子を含むベクターによるマウスハイブリドーマの形質転換によって作出される。このような細胞系は、クーカーラパティ(Kucherlapati)らによって、PCT国際公開公報第91/10741号(1991年7月25日公開)でも説明されており、ヒト免疫グロブリンの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を組み込まれたマウスからの、抗原特異的なヒトモノクローナル抗体の産生について開示している。こうしたマウス由来のB細胞を用いて、ハイブリドーマ作製の定法によって、ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作出する。

略図Aにおける本発明の方法は、改変されるべき定常領域遺伝子に隣接したlox部位を一個だけ組み込む必要がある。この略図において、第一のlox部位は、ゲノムDNAとの部位特異的な相同的組換えによって改変定常領域(ヒトC_H)に置換されるべき定常領域遺伝子(ヒトC_L)に隣接して組み込まれている。第二のlox部位と選抜マーカー遺伝子(DHFR)とを含むベクター(環状DNAからなる)を細胞の中に形質導入すると、lox部位は、一過的にCreと相互作用する。上述したように、Creは、cre遺伝子を一過的に発現するベクターを同時形質導入することによって提供される。ゲノムのlox部位を、環状ベクター上のlox部位で、Cre媒介により部位特異的に組換えると、ゲノムの中に、選抜マーカー(DHFR)を持った改変配列

(C_H)の挿入が起こる。望ましい形質転換細胞は、DHFR遺伝子とC_H遺伝子に隣接したlox部位を2つ有するが、Creのさらなる発現がなければ安定で、DHFRマーカー遺伝子(すなわち、図1に「Met^R」で示してあり、メトトレキセート薬剤耐性)の発現で選抜して得られる。各形質転換および選抜段階の後に、免疫グロブリン遺伝子座に望ましい改変が加えられていることの証明は、上述されている、PCR増幅などによる、従来の遺伝子解析法によって提供される。

図2は、Cre媒介部位特異的組換えと、抗体産生細胞のゲノムの中の2つのlox

部位を用いて、改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作出するための、本発明に係る方法の別の態様（略図B）の概略図を示している。この方法は、部位特異的な相同的組換えによって、改変定常領域（ヒトC_H）で置換されるはずのゲノム配列の定常領域遺伝子（ヒトC_H）に隣接する2つのlox部位を挿入することを含む。図2に示すように、この細胞は、次に、lox部位のそれぞれを挿入するための、2つの相同標的ベクターで形質転換または同時形質転換される。図2で例示されているように、hyg選抜マーカー遺伝子（すなわち、ハイグロマイシン耐性「Hyg^R」選抜）とneo選抜マーカー遺伝子（すなわち、「G418^R」で示される、G418薬剤耐性の選抜）とを用いるなど、lox部位を導入するために用いられる各ベクターは、異なる選抜マーカー遺伝子を有する。この2つの挿入lox部位を有する組換え細胞は、両方のマーカーに関する選抜を連続的にまたは同時に行なうことによって得られる。いずれの場合においても、2つの相同標的ベクターが適正に組み込まれることによって起こる結果は、2つの挿入lox部位が、置換されるべき遺伝子（C_H）の近傍に置かれ、lox部位挿入のために用いられた選抜マーカー遺伝子も、挿入lox部位の近傍に置かれることである。

付加的なlox部位、改変配列（C_H）および第三の選抜マーカー遺伝子（DHFR）とを含むベクター（環状DNAからなる）を細胞の中に形質導入すると、lox部位は、Creと相互作用する。上述したように、Creは、cre遺伝子を一過的に発現するベクターを同時形質導入することによって提供される。改変配列は、lox部位のCre媒介部位特異的組換えによって、第二の選抜マーカー遺伝子とともに、ゲノム配列の中に挿入され、ベクターと一方または他方のlox部位がゲノム配列に挿入される。図2で例示されているように、置換されるべき定常領域遺伝子（C_H）に隣接す

るlox部位に改変配列が組み込まれると、その後、さらに、Cre媒介部位特異的組換えによって、第一のマーカー遺伝子（hyg）、第二のマーカー遺伝子（neo）、および置換されるべき遺伝子（C_H）の切り出しが起こる細胞がある。このため、第三のマーカー遺伝子（DHFR）を発現し、第一と第二のマーカー遺伝子を発現しない、すなわち、図2では、メトトレキセート耐性（「Met^R」）で、薬剤G418

に感受性（「G418^s」）、かつ、ハイグロマイシン感受性（「Hyg^s」）の形質転換細胞を選抜することによって、望ましい形質転換細胞が得られる。

ジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子の変異遺伝子（*DHFR）は、もともと、シモンセン(Simonsen)およびレビンソン(Levinson) (1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495~2499) によって、メトトレキセート薬剤に対して、野生型よりも親和性が弱いと説明されていた遺伝子であるが、これを用いて、正常なDHFR遺伝子を保持している細胞での選抜を行なう。メトトレキセート濃度を段階的に上昇させると、同時に、DHFRに結合した遺伝子にコードされた蛋白質の産生が増加することによって、DHFRとそれに結合した遺伝子の遺伝的な増幅がもたらされる。このように、突然変異を起こしたDHFRマーカー遺伝子は、遺伝子増幅により、免疫グロブリン産生のレベルを強化するという利点を提供する。

実施例2

組み込まれたlox部位を含むマウスハイブリドーマ細胞で産生される

ヒト抗体の「クラス転換」

図3は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変された定常領域を有するヒト抗体分子を発現する細胞を作製するための、本発明に係る方法の、さらに別の一つの態様（略図C）の概略図を示している。改変されるべき細胞は、改変された定常領域に変換されるべきヒト定常領域遺伝子を含むゲノムを有するリンパ様細胞系（ハイブリドーマ）に由来している。第一のlox部位は、改変定常領域（C_v）に置換されるべき定常領域遺伝子（ヒトC_μ）に隣接して組み込まれている。より特定すれば、概略図Cは、ヒト領域のC_μエンハンサー配列（E_μ）と、C_μエクソン「I」（I_μ）、および、C_μ転換配列（S_μ）の5'側にあるlox部位を示してる。

このような細胞系は、例えば、「フェル(Fell)ら（前記）」で説明されているような相同的組換えを用いて組み込まれたヒト定常領域遺伝子を含むマウスハイ

ブリドーマを形質転換して作出してもよい。ここで、ベクターの定常領域は、慣習的な遺伝子工学的的方法によって、lox部位を挿入することによって改変されている。また、本明細書で既に説明されているような、生殖系DNAの中に組み込ま

れたlox部位を含む遺伝子導入マウスに由来するB細胞のハイブリドーマを、従来からのハイブリドーマ作製法によって作製して、このような細胞系を作出してもよい。

概略図Cにおける本発明の方法は、改変されるべき定常領域遺伝子に隣接して、lox部位を一個だけ挿入する必要がある。この略図において、第二のlox部位と選抜マーカー遺伝子 (DHFR) とを含むベクター (環状DNAからなる) を細胞の中に導入し、上述のようにして、lox部位をCreと一過的に相互作用させる。ゲノムのlox部位を、環状ベクター上のlox部位で、Cre媒介により部位特異的に組換えることにより、ゲノム中に選抜マーカー (DHFR) を持った改変配列 (C_γ) が挿入される。望ましい形質転換細胞は、DHFR遺伝子とC_γ遺伝子とに近接したlox部位を2つ有するが、Creのさらなる発現がなければ安定で、DHFRマーカー遺伝子 (すなわち、図3に「Met^R」で示してあり、メトトレキセート薬剤耐性) の発現で選抜して得られる。各形質転換と選抜段階の後に、免疫グロブリン遺伝子座に望ましい改変が加えられていることの証明は、上述のようなPCR増幅などの、従来の遺伝子解析法によって提供される。

配列表

(1) 一般情報:

- (i) 出願人: Jakobovits, Aya
Zsebo, Krisztina M.
- (ii) 発明の名称: Cre媒介部位特異的組換えを用いる抗体の作製
- (iii) 配列数: 3
- (iv) 文書通信情報:
- (A) 宛名: CELL GENESYS, INC.
- (B) 街路名: 322 LAKESIDE DRIVE
- (C) 市名: FOSTER CITY
- (D) 州名: CALIFORNIA
- (E) 国名: USA
- (F) 郵便番号: 94404
- (v) コンピューター読み取りフォーム:
- (A) メディア形式: Floppy disk
- (B) コンピューター: IBM PC Compatible
- (C) 運転システム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) 現出願データ:
- (A) 出願番号:
- (B) 出願日: 29-MAR-1995
- (C) 分類:
- (viii) 弁理士/代理人情報:
- (A) 氏名: MANDEL, SARALYNN
- (B) 登録番号: 31,853
- (C) 明細書/参照番号: CELL20
- (ix) 電気通信情報:
- (A) 電話: (415) 358-9600 X345

(B) ファックス : (415) 349-7392
(C) テレックス :

(2) 配列番号 : 1 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 配列の長さ : 34 塩基対
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 一本鎖
(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 1 :

ATAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT

34

(2) 配列番号 : 2 の情報 :

(i) 配列の特性 :

(A) 配列の長さ : 34 塩基対
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 一本鎖
(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 2 :

ACAACTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTAT

34

(2) 配列番号 : 3 の情報 :

(i) 配列の特性 :

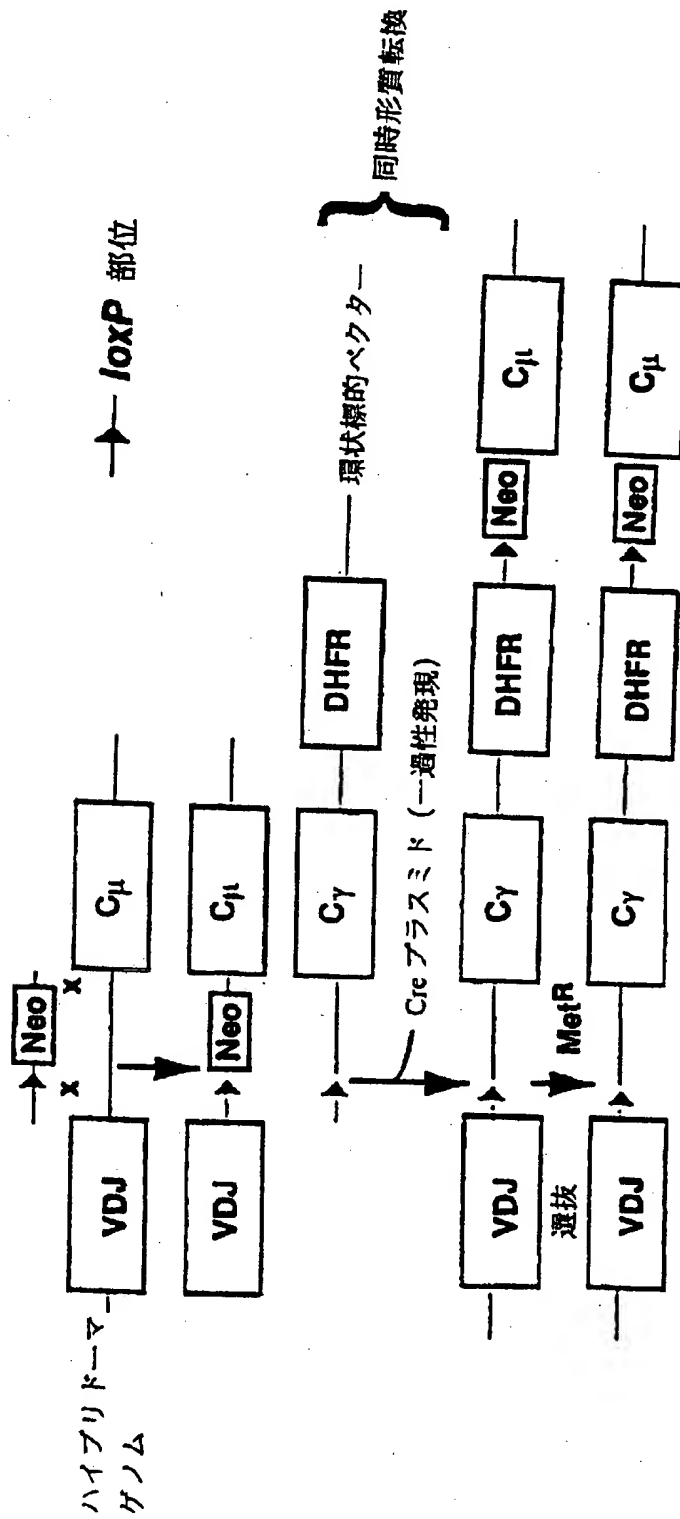
(A) 配列の長さ : 34 塩基対
(B) 配列の型 : 核酸
(C) 鎖の数 : 一本鎖
(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : DNA (genomic)

(xi) 配列の記載 : 配列番号 : 3 :

ATAACTTCGT ATAATGTATA CTATACGAAG TTAT

The seal of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) is located at the bottom left of the page. It consists of a square frame containing the Japanese characters '文部科学省' (MEXT) in a stylized font.



【図2】

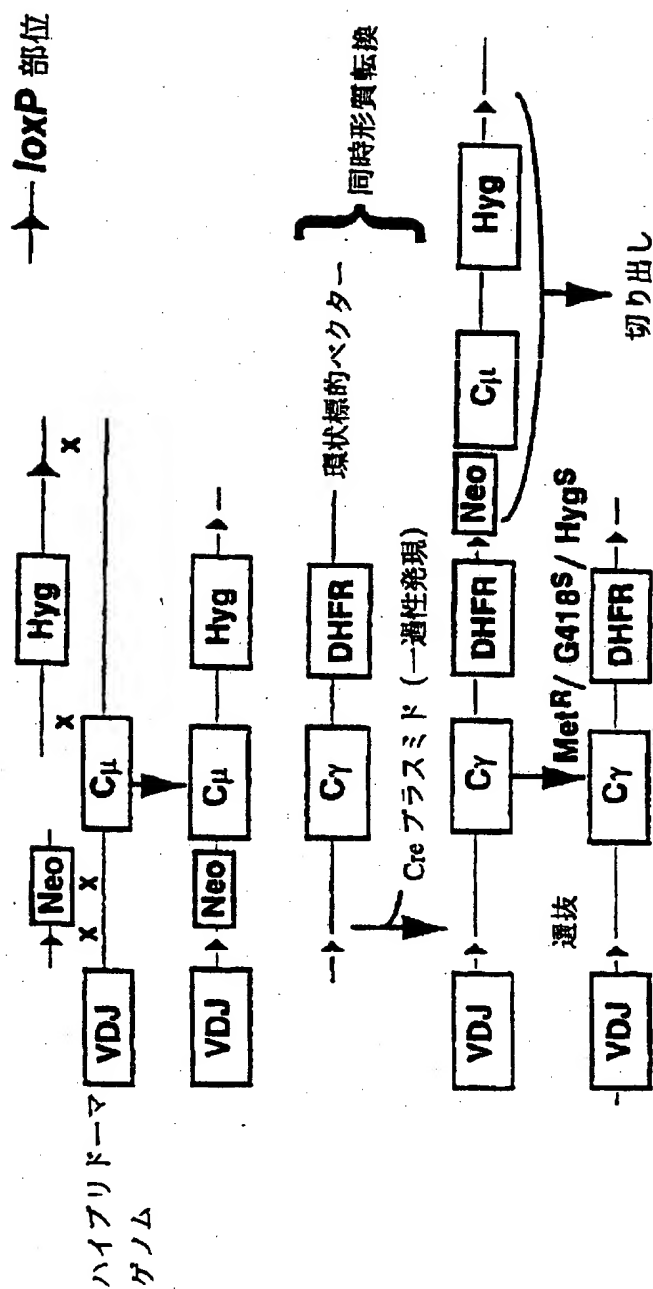


図2

【図3】

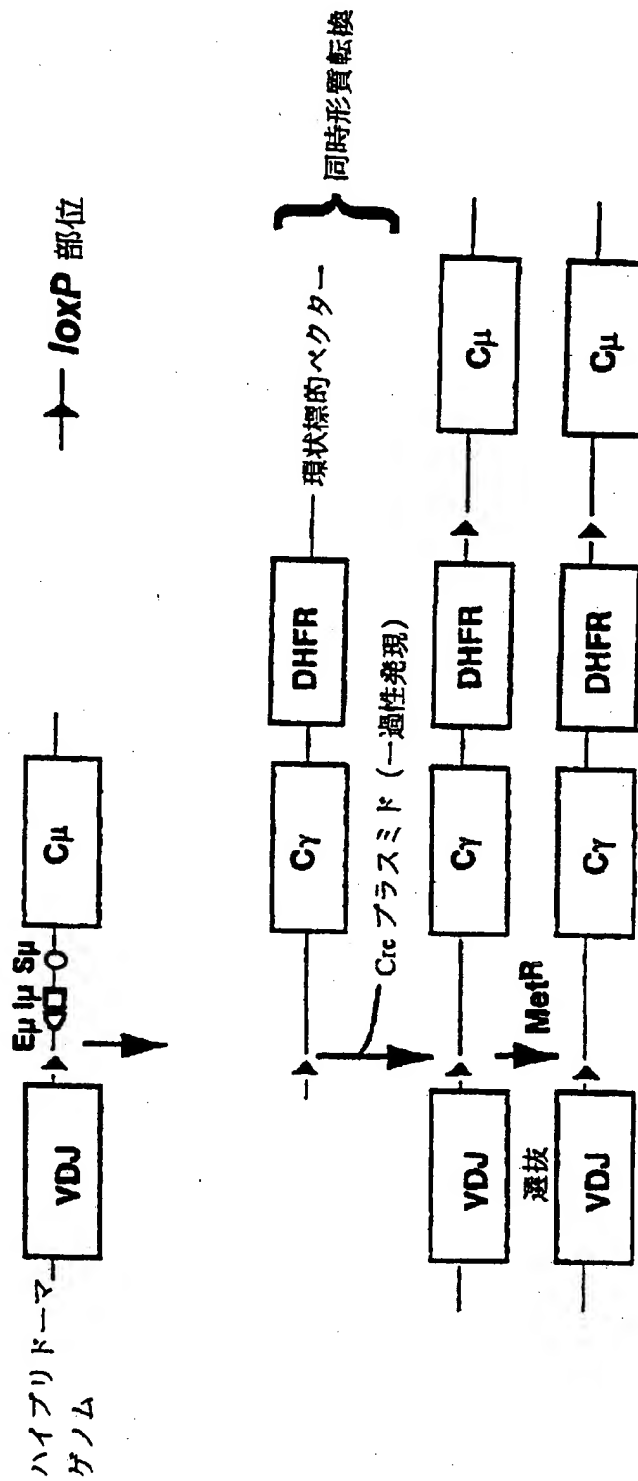
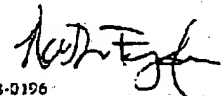


図 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/04445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : C12N 5/00, 5/06, 5/16, 15/00, 15/06, 15/09, 15/13 US CL : 435/172.3, 240.21; 800/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/172.3, 240.21; 800/2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases: STN, Biosis, CA Search Terms: Jakobovits?/au; zsebo?/au; homolog?; recomb?; cre; lox; es; embryonic; stem; immunoglob?; heavy; light; antibod?; immune; constant; variab?		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GU, H. et al., Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-LoxP-mediated Gene Targeting. Cell. 18 June 1993, Vol. 73, pages 1155-1164, see entire document.	1-10
Y	CAPECCHI, M.R., Altering the genome by homologous recombination. Science. 16 June 1989, Vol. 244, pages 1288-1292, see entire document.	1-10
Y	WO 94/02602 A1 (CELL GENESYS, INC.) 03 February 1994, see entire document.	1-10
Y	US 5,202,238 A (H.P. FELL, JR. ET AL.) 13 April 1993, see entire document.	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 JULY 1996		29 AUG 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer BRIAN R. STANTON 
Facsimile No. (703) 305-3230		Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/04445

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,959,317 A (B.L. SAUER) 25 September 1990, see entire document.	1-10

フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, I S, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN